

VÝZNAM STANOVENÍ AKTIVITY TELOMERÁZY V ONKOLOGII TELOMERASE ACTIVITY AND ITS IMPORTANCE IN ONCOLOGY

M. ŠIMÍČKOVÁ, M. ČERNOCH

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: Stárnutí somatických buněk, které se projevuje jejich neschopností neomezeně se dělit, je řízeno procesem postupného zkracování konců chromozomů, které se nazývají telomery. Zárodečné a nádorové buňky však mají mechanismus, jak působit proti tomuto replikačnímu stárnutí: účinkem ribonukleoproteinového enzymu telomerázy je možno zkracování telomer zabránit. V práci jsou shrnuty poznatky o procesu neúplné replikace 3'-konce matricového DNA řetězce v somatických buňkách, o mechanismu působení telomerázy a její roli v procesu nádorové biologie.

Klíčová slova: telomery, telomeráza, immortalita, lidské benigní a maligní nádory

Summary: The senescence of somatic cells caused by limited number of their possible divisions is regulated by the process of gradual length reduction of the ends of chromosomes, called telomeres. However, tumor and germ cells possess a regulatory mechanism for eliminating this replicative senescence by means of telomerase, a ribonucleoprotein enzyme which is able to prevent telomere length reduction. In this work we describe new knowledge about the „DNA end replication problem“ in somatic cells, about the reaction of telomerase, and its role in tumor biology.

Key words: telomeres, telomerase, immortality, human benign and malignant tumors

Molekulární genetika zabývající se dvěma kontroverzními procesy - stárnutím normálních somatických buněk a naopak nesmrtností zárodečných a nádorových buněk - zaznamenala v posledním období velký pokrok. Stárnutí somatických buněk může být způsobeno postupným zkracováním specifických zakončení eukaryontních chromozomů - telomer - při každém mitotickém dělení. Při určité minimální délce telomer není už další dělení možné, buňka umírá. Naopak zárodečné a nádorové buňky nemají tento replikační limit, protože exprimují ribonukleoproteinový enzym telomerázu, který umožňuje udržovat telomery v dostatečné délce a tím zaručuje těmto buňkám immortalitu.

1. Biologie procesu replikačního stárnutí

Většina buněk eukaryontů, které se mohou dělit in vivo, nemá možnost dělení neomezenou. Proces, který limituje proliferační potenciál buněk, byl popsán pro lidskou buněčnou linii fibroblastů již před více než 30 lety a byl nazván buněčné (replikační) stárnutí („cell [replicative] senescence“) (1). Počet buněčných dělení, která proběhnou v somatické buňce před ukončením jejího života, závisí na živočišném druhu, stáří organismu, typu buněk a genetickém charakteru jedince. Toto číslo může dosahovat pro fetální nebo neonatální buňky hodnoty 60 až 80 dělení, pro určitou buněčnou linii je vysoce reprodukovatelné. Počet zbývajících možných dělení závisí, jak bylo prokázáno, na délce telomer (1).

Z dosavadních závěrů genetické analýzy se zdá být zřejmé, že stárnutí je geneticky dominantní, zatímco immortalita je znak recesivní (2). Tento závěr je založen především na výsledcích fúzí normálních proliferujících buněk s buňkami z nesmrtných nádorových linií a vzájemných fúzí buněk mezi různými nádorovými liniemi (2). Existuje alespoň deset genetických míst dosud neidentifikovaných genů na chromosomech 1-4, 6, 7, 10, 11, 18 a X, která se podílejí na replikačním potenciálu buňky (2).

Buňka, u které došlo k poslednímu možnému dělení, se dostává do fáze zablokování postupu buněčného cyklu k dělení vli-

vem represe alespoň tří transkripčních regulátorů, a to c-fos, Id a E2F, ev. indukce inhibitorů cyklin-dependentních kináz (např. p21, p16) (2, 3). Vysvětlení produkce těchto látek je dosud hypotetické: kritické zkrácení telomer může navodit např. uvolnění proteinů původně na telomery navázaných, které spustí proces aktivace původně blokovaných genů (3). Bylo prokázáno, že start programu replikačního stárnutí je závislý rovněž na přítomnosti inhibitoru telomerázové aktivity (2). Proces stárnutí se zdá být resistentní k apoptóze a nezávislý na jejích stimulech (4). Fenotypicky se projevují u stárnoucích buněk nejenom změny v morfologii (obvykle zvětšení buněk), ale i v expresi určitých genů (2). Tento fyziologický proces omezení buněčné proliferace se zdá být velice nadějný, pokud jde o možnost jeho využití pro nádorovou supresi.

2. DNA struktura na konci eukaryontních chromozomů a její replikace

Konce eukaryontních chromozomů - telomery - jsou u člověka tvořeny repetitivními sekvencemi bází TTAGGG. Tyto části DNA tvoří spolu s proteiny zvláštní strukturu na konci chromozomů, která zabraňuje jejich fúzím, degradaci a translokaci - tzn. podílejí se na zachování stability eukaryontního genomu. Telomery mají dále vliv rovněž na lokalizaci chromozomů v jádře, párování homologních chromozomů v časně fázi dělení a jejich pohyb během dělení (5).

Telomerové repetitivní sekvence různých organismů mají obvykle velikost 6 - 8 párů bází, i když existují delší sekvence (např. druh *Candida* má 20 - 25 párů bází). Aktuální počet kopií kolísá nejen podle délky života buňky, ale je i druhově závislý (u myši více než 10 000 kopií, u člověka 500 až 2 000 kopií (3 000 - 12 000 párů bází) (5). Úplný konec telomer tvoří často skupina 2 - 4 G; struktura této části je zřejmě rovněž velice důležitá, ale její funkce dosud není detailně poznána (5).

Princip zkracování telomer u normální somatické buňky a působení telomerázy jsou vysvětleny na obr. 1 a 2 (6-9). DNA polymeráza katalyzuje syntézu dceřiného vlákna DNA od místa zahájení replikace, tj. replikační vidlice (replication fork), ve

směru 5' - 3' dceřiného řetězce kontinuálně, toto vlákno se nazývá vedoucí řetězec („leading strand“) (obr. 1). V opačném směru od místa zahájení replikace však probíhá syntéza dceřiného řetězce složitěji, a to diskontinuálně po malých úsecích oligonukleotidů (každý opět ve směru 5' - 3'), tzv. Okazakiho fragmentech (obr. 1). Napojení každého z nich musí být zahájeno (podobně jako je tomu i u vedoucího řetězce) navázáním krátkého RNA primeru na maticový řetězec. RNA primery jsou v další fázi enzymaticky odbourány a nahrazeny odpovídajícími sekvencemi DNA. Nakonec jsou jednotlivé úseky pospojovány DNA-ligázou. Takto syntetizovaná část dceřiného DNA se označuje jako opožďující se řetězec (lagging strand) (obr. 1). Na 5' - konci dceřiného řetězce DNA však nemůže být RNA primer nahrazen sekvencí DNA (je jen odštěpen), a proto dochází k jeho neukončené replikaci, a tedy ke zkrácení (obr. 2a). Popsaný mechanismus katalytického působení DNA polymerázy způsobuje, že po každé replikaci jsou dceřiného řetězce DNA na 5' - koncích vždy o něco kratší (problém neúplné replikace, „end replication problem“) (7, 9). Konec chromozomu (telomera) tak ztrácí při každém buněčném dělení (v S-fázi buněčného cyklu) 8 - 12 párů bazí DNA. Podle posledních údajů existují v savčích chromozomech kromě těchto chromozomů s tupým zakončením (se zarovnanými konci, „blunt end termini“) (obr. 2a) rovněž chromozomy s přesahujícím 3' - zakončením (chromozomy s přesahujícími, posunutými konci) („overhanging termini“) (6). Replikaci chromozomů s posunutými konci dochází uvedeným mechanismem k tvorbě tupých zakončení zkrácením 3' - konce na vedoucí řetězci DNA. Řešení uvedeného problému postupného zkracování telomer při každém mitotickém dělení umožňuje účinek telomerázy (9) (obr. 2b). Její působení spočívá v tom, že katalyzuje vazbu repetitivních sekvencí bazí na 3' - konci nezreplikovaného maticového řetězce, který je primerem pro telomerázu, za vytvoření přesahujícího 3' - konce (přesahujícího původní délku mateřského řetězce). Následně je pak působením DNA polymerázy (již popsáním mechanismem s pomocí RNA primeru atd.) prodloužen i dceřiný řetězec v místě původní „mezery“. Pravděpodobně působením nukleázy jsou pak - u chromozomů s tupým zakončením - přesahující konce řetězců zkráceny na původní (tj. mateřským odpovídající) délku (obr. 2b) (6). Obdobným mechanismem zajišťuje telomeráza vytvoření stejně dlouhé dceřiného kopie DNA i u chromozomů s přesahujícím 3' - koncem.

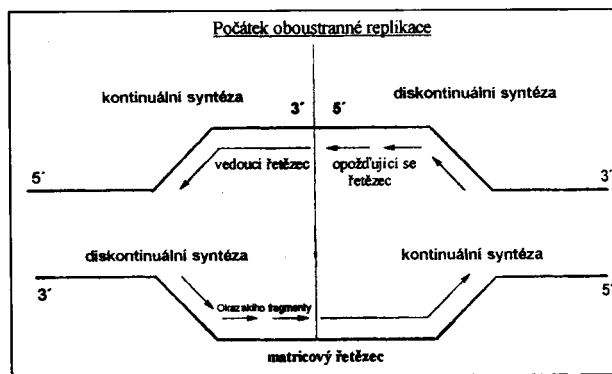
3. Metoda průkazu aktivity telomerázy

Metoda stanovení aktivity telomerázy (TRAP = Telomerase-Repeat Amplification Protocol) (10) je založena na několika krocích. V první části reakce dochází účinkem telomerázy k vazbě telomerových repetitivních sekvencí na 3' - konec syntetického primeru. V druhém kroku je produkt telomerázové reakce amplifikován metodou PCR (polymerázové řetězové reakce) za užití druhého primeru, který obsahuje sekvence komplementární k vlastnímu telomerázovému produktu. Amplifikovaný produkt je detekován buď elektroforézou a následnou autoradiografií, při označení jednoho z nukleotidů ^{32}P se na gelu objeví typický obraz heterogenního produktu s „žebříkovitě“ narůstajícími zónami lišícími se vždy o 6 párů bazí. Druhá možnost detekce amplifikovaného produktu je umožněna hybridizací se specifickou detekční sondou a následnou imunochemickou reakcí (komerční souprava Telomerase PCR ELISA, Roche, nebo TRAPeze - ELISA Telomerase Detection Kit, Oncor).

Uvedená TRAP metoda je pouze semikvantitativní, pro srovnání závěrů různých studií je třeba zvažovat možné nestandardní kroky při vyšetření. Jsou však vyvíjeny postupy, jejichž pomocí je možno přítomnost ribonukleoproteinového enzymu kvantifikovat. Senzitivita metody TRAP je vysoká - aktivitu lze prokázat v materiálu obsahujícím 1 μg proteinu v extraktu, nebo 10^3 buněk.

Vedle stanovení aktivity telomerázy uvedeným postupem je

Obr. 1. Schema replikace eukaryontní DNA - replikační vidlice (podle 8).

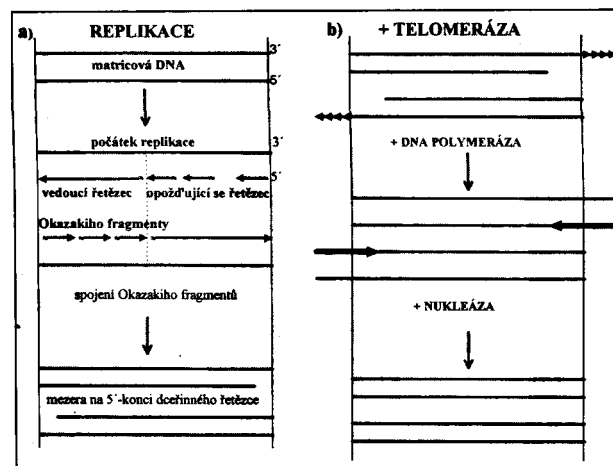


v posledním období využíváno detekce RNA složky telomerázy (hTR), jejíž pomocí lze rovněž rozlišit preinvasivní a invazivní neoplastický proces (11, 12). Kromě vlastní aktivity telomerázy je často stanovována i délka repetitivních sekvencí telomer, které mohou být v určité fázi procesu charakteristické (13). Rovněž tato metoda vyžaduje standardizaci (14).

4. Telomeráza a její role v procesu nádorové biologie

Telomeráza, ribonukleoprotein, který umožňuje syntézu repetitivních telomerových sekvencí na koncích chromozomů, je citlivá na štěpení RNázou a na zvýšenou teplotu (15). Sekvence její RNA je u mnoha nižších živočichů známá (výzkum byl zahájen na prvku druhu Tetrahymena), obsahuje 150 - 200 nukleotidů u prvoků, asi 1300 nukleotidů u kvasinek, 450 u savců (15). Sekundární struktura dosud nebyla určena. Lze předpokládat, že na funkčním telomerázovém komplexu se budou podílet rovněž proteiny. Proteinová část může vytvořit vazebná místa pro uchycení DNA i nukleotidů, tzn. může být důležitým regulátorem biologické aktivity ribonukleoproteinového enzymu. Dosud byly popsány především proteiny asociované s telomerázou typu TP1 a TP2 (16). Pozornost je rovněž soustředěna na proteiny vážící se přímo na telomery. V poslední době byl prokázán savčí protein TRF1 (17). Je to vazebný faktor pro telomerovou repetitivní sekvenci, má velikost 60 kDa, jeho C-koncová doména vykazuje homologii s MYB-onkoproteiny. Je vázán na telomery pravděpodobně v dimeru. Jeho funkce spočívá především v mechanické ochraně telomer, a dále se spoluúčastní regulace jejich délky. Na analýze dalších proteinů, podílejících se na tvorbě telo-

Obr. 2. Problém neúplné replikace chromozomů: a) Postup replikace v případě zarovnaných, tupě zakončených chromozomů. b) Mechanismus účinku telomerázy (podle 6).



merového komplexu i vlastního komplexu s telomerázou (18), se v současnosti intenzivně pracuje.

Vlastní reakční mechanismus působení telomerázy je obdobný reakci DNA-polymerázy nebo reversní transkriptázy (obr.3) (6). Zjednodušeně lze reakci popsat jako třístupňovou: a) navázání krátké telomerické sekvence na 3'-nezreplikovaném matricovém konci chromozomu na vazebnou doménu telomerázové RNA, b) templátem - řízená adice nukleotidů a c) translokace, která umožní opakované užití totožné oblasti pro další vazbu. Vlastní vazebná doména je tvořena 5 nukleotidy, na něž se váže 3'-terminální DNA primer. Templátová doména umožňuje syntézu nové repetitivní sekvence (člověka: TTAGGG) na komplementární sekvenci nukleotidů telomerázy (obr. 3b - nově navázaný oligonukleotid je označen malými písmeny). Translokací dojde k uvolnění templátové domény a k další možné vazbě nukleotidů (obr. 3c) (6).

Již od počátku 90. let se objevily spekulace o významu telomerázy pro udržení nesmrtnosti nádorových buněk, které byly doloženy velkým množstvím experimentálního materiálu (19,20). Tři buněčné typy, a to zárodečné buňky, určité kmenové buňky a buňky mnohých maligních nádorů, nepodléhají procesu replikačního stárnutí. Zároveň jsou tyto buňky charakteristické tím, že vykazují expresi telomerázy. Telomeráza je aktivní v zárodečných buňkách vyvíjejícího se embrya, délka jejich telomer je konstantní (obr. 4). V somatických buňkách je enzym reprimován, telomery se během replikace chromozomů zkracují ke kritickému momentu, kdy buňka odumírá. Dojde-li však v buňkách k mutaci navozující maligní proces, pak signál k zastavení dělení je potlačen či buňky jej ignorují. Je-li genetický zásah dostatečný k indukci tvorby aktivní telomerázy, pak buňky, které neztratily kompletně telomery, pokračují v dělení a získávají nesmrtnost (19, 20). Na prvních pilotních studiích bylo prokázáno, že telomeráza je přítomna nejen v liniích nádorových buněk in vitro (tab.1) (20, 21), ale i v převážně většině lidských maligních nádorů (tab.2). Bylo prokázáno, že telomery v lidských nádorech jsou kratší než v buňkách okolní tkáně.

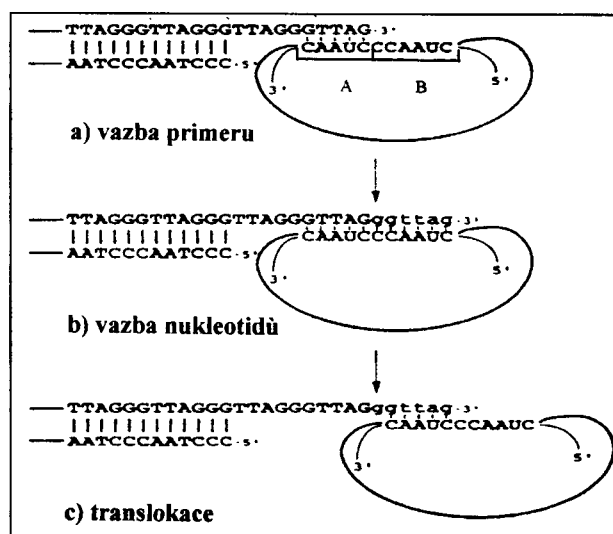
Z této obecné hypotézy se však některé experimentálně prokázané modely vymykají. Je zřejmé, že telomeráza není vždy nutná - a naopak její přítomnost není vždy jediným dostatečným impulzem - k udržení immortality buněk (19, 20). Bylo dokázáno, že normální lidské T-buňky po aktivaci exprimují telomerázu, a přece jsou jejich telomery v průběhu dělení zkracovány (15). Spekulativním vysvětlením může být nedostatečná kvantita enzymu, ev. jeho modifikace apod. Některé nádorové buňky pravděpodobně telomerázu neprodukuje, přestože se aktivně dělí (22) nebo mají charakter nesmrtnosti. Zajímavé výsledky byly zjištěny při studiích na myších. Během tumorigeneze byla naměřena zvýšená aktivita telomerázy, kdy nedochází k podstatnému zkrácení telomer. Buněčné linie odvozené z myši, u nichž však byla provedena delece RNA komponenty telomerázy, byly schopny immortalizace, transformace virovými onkogeny a tvorby nádoru po transplantaci (23). Je tedy zřejmé že telomeráza není vyžadována pro onkogenní transformaci ani produkci tumoru u myši.

Telomeráza je rovněž negativní, vystoupí-li buňka z procesu buněčného cyklu z důvodu buď diferenciace, nebo klidového stavu. Přestože byla prokázána telomerázová aktivita v některých normálních lidských tkáních, a naopak některé nesmrtné buňky neměly telomerázu prokazatelnou, lze obecně říci, že telomeráza koreluje s proliferací nádorových buněk (22). Vztah telomerázové aktivity k proliferaci byl prokázán především na liniích nádorových buněk. Její aktivita je rovněž zvýšena, je-li např. (normálně velice slabě produkující) kůže stimulována (po poranění) k tvorbě proliferující bazální membrány. Endometriální tkáň vykazuje rovněž změny v aktivitě tohoto enzymu ve vztahu k proliferaci během menstruačního cyklu (24, 25).

Je třeba si však uvědomit, že na procesu buněčného stárnutí se podílejí vedle telomerázy i další možné mechanismy, např. produkt supresorového genu p 53 (3).

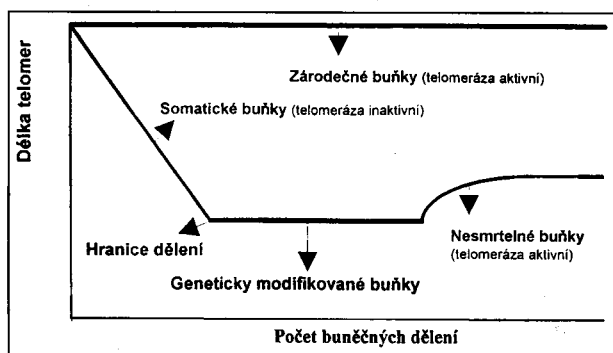
Obr. 3.

Obecný mechanismus telomerázové reakce. A: vazebná doména, B: templátová doména (podle 6).



Obr. 4.

Schema replikačního stárnutí somatických buněk a vliv telomerázy na zachování immortality zárodečných a nádorových buněk ve vztahu k délce telomerů (podle 20).



5. Klinický význam stanovení aktivity telomerázy

Bylo prokázáno, že telomeráza může být užitečným diagnostickým markerem pro stanovení stadia onemocnění, dále i prognostickým markerem vývoje onemocnění. Nemenší role je jí přičítána při diferenciálně-diagnostickém rozhodování mezi

Tab. 1.

Aktivita telomerázy v immortalizovaných lidských buněčných liniích (podle 21).

Buněčný typ	Telomeráza + b	Telomeráza -
Epitel mléčné žlázy	21	0
Bronchiální epitel	9	1
Epitel retiny	1	0
Embryonální ledvina	2	0
B-lymfocyty	2	0
T-lymfocyty	1	0
Mesotel	3	1
Fibroblasty ^a	28	21
Kožní keratinocyty	6	0
Cervikální keratinocyty	1	0
Celkem	74	23

^a Fibroblasty mléčné žlázy, bronchů, jater, plic, prostaty a kůže.

^b Stanovení telomerázové aktivity provedeno obvykle TRAP metodou (viz Materiál, metody).

Tab. 2.
Aktivita telomerázy v maligních nádorech (podle 28, 29)

Maligní nádory	Pozitivní	Celkem	% pozitivních
hlavy a krku	112	130	86,2
plic	113	140	80,7
GIT	195	223	87,4
pankreatu	41	43	95,3
jater	149	173	86,1
prsu	673	780	87,2
ženských reprodukčních orgánů	49	51	96,1
mužských reprodukčních orgánů	52	58	89,7
ledvin a močového traktu	273	306	89,2
kůže	94	102	92,2
hematologické	143	180	79,4

benigním a maligním onemocněním. Možnost stanovit telomerázu ve velice malém vzorku nádoru umožňuje využít různé neinvazivně získané vzorky, např. odběry tenkou jehlou, z výplachů úst, bronchů, buněk uvolněných do moče apod. Studium úlohy telomerázy v procesu maligní transformace je zaměřeno na čtyři oblasti: a) exprese v preinvazivní či časné invazivní fázi, b) exprese v invazivních maligních nádorech, c) význam pro odhad prognózy onemocnění, d) význam pro terapii.

ad a) Bylo potvrzeno, že telomeráza je exprimována v preinvazivním maligním onemocnění tlustého střeva, hlavy a krku a plic (26-29). Její aktivita koreluje s histopatologickým stupněm, je však výrazně slabší ve srovnání s maligní tkání. Telomeráza byla prokázána v lyzátu buněk uvolněných do výplachu lumina střeva u 9 z 15 případů karcinomu tlustého střeva a u žádného vzorku nemocných s ulcerativní kolitidou či Crohnovou chorobou (26). Intenzivně je studována telomeráza i v prekancerózách dalších lokalizací, především prsu. Představa jednoznačné diferenciativní diagnostické pomůcky TRAP stanovení pro odlišení benigního a maligního procesu v prsu je v poslední době poněkud korigována: pokud nebude metoda stanovení aktivity přísně kvantitativní (ev. TRAP analýza nebude alespoň prováděna v řadě ředění jednoho vzorku), pak může docházet k falešně pozitivním závěrům. Telomeráza byla v omezené míře prokázána jak ve tkáni fibroadenomů, tak i u dysplasií. Jejím zdrojem může být určitý podíl buněk proliferujících, ev. se uvažuje i o možném vlivu přítomných kmenových buněk, které se diferencují buď na epiteliální, nebo myoepiteliální buňky (27).

ad b) Výskyt měřitelné aktivity telomerázy v jednotlivých nádorových lokalizacích je shrnut v tab.2 (28, 29). Nejpočetnější je zastoupeno vyšetřování maligních a benigních nádorů prsu. V tab.3 jsou ilustrovány souhrnné výsledky dosud publikovaných prací (11, 13, 27, 30-37). Je zřejmé, že náleží minimální aktivity ve velice malém počtu vzorků normální tkáně i tkáně dysplastické (4,5 % a 15,8 %) nemůže zásadně zkreslit význam tohoto vyšetření: z dosud analyzovaných 780 duktálních i lobulárních karcinomů bylo 86,3 % pozitivních, pozitivita je obvykle velice výrazná. Negativita byla nalezena vždy ve tkáni fibrocystické dysplasie, zatímco významné je zjištění vysoké pozitivivity u 83,3 % nádorů in situ. Velký význam bude mít hodnocení biopsie při odběru vzorku tenkou jehlou, kdy metoda TRAP umožní pracovat s minimálním množstvím materiálu a po standardizaci napomůže v rozlišení maligní a benigní tkáně.

Rovněž gynekologické nádory exprimují telomerázu ve velkém procentu případů. Byly nalezeny signifikantní diference v benigních, premaligních a maligních tkáních této lokalizace. Zdá se tedy, že aktivace telomerázy je kritickým krokem ve vývoji maligního nádoru této lokalizace (38-40). V premaligních intraepiteliálních cervikálních lézích je telomeráza exprimována, nekoreluje s výskytem lidského papilomaviru (41, 42). Nádory močového měchýře patří k lokalizacím, kde bude

Tab. 3.
Aktivita telomerázy v benigních a maligních postiženích prsu (podle 11, 13, 27, 30-37)

Tkáň prsu	Pozitivní	Celkem	% pozitivních
Normální	1	22	4,5
Dysplastická	3	19	15,8
Fibrocystická choroba	0	51	0
Fibroadenom	34	122	27,8
Karcinom in situ	20	24	83,3
Invazivní duktální a lobulární karcinom	673	780	86,3
Sousedící s karcinomem	4	85	4,7

vyšetření telomerázy z neinvazivně získaného vzorku významným parametrem pro hodnocení maligního procesu. Jeví se totiž, že senzitivita stanovení maligního procesu pomocí tohoto vyšetření z moče je minimálně shodná se závěry cytologického vyšetření, navíc není zatížena jeho chybou odečtu (43). Výhodou je také velice nízká falešná pozitivita (44).

Rovněž další nádorové lokalizace, tak jak je uvedeno v tab.2, jsou vhodným objektem, kde telomerázová aktivita rozliší mezi benigním a maligním procesem. Práci ve všech oblastí nádorových lokalizací v poslední době přibývá geometrickou řadou, k definitivnímu závěru je třeba vyčkat na výsledky prospektivních studií s kvantitativním vyšetřením telomerázové aktivity a dostatečným počtem případů.

ad c) Zhodnocení významu stanovení aktivity telomerázy pro predikci vývoje onemocnění je dosud neuzavřeno. Pro studie, které mohou přispět k řešení tohoto problému, musí být definována stabilita enzymu v materiálu zpracovávaném retrospektivně, ev. pro prospektivní studie je třeba dodržet určitý čas sledování nemocných. Dosud bylo prokázáno, že přítomnost telomerázové aktivity koreluje se špatnou prognózou vývoje onemocnění u karcinomu žaludku (45) a u neuroblastomů (46). Známé prognostické ukazatele u karcinomu prsu vykazují rovněž signifikantní přímý vztah k aktivitě telomerázy (30).

ad d) Terapeutické využití telomerázy je dosud propracováno především na experimentálních modelech. RNA složka telomerázy, působící jako templát pro vazbu repetitivní sekvenční TTAGGG tvoří ideální cíl pro inhibici specifickými oligonukleotidy. V in vitro pokusech byla studována možná inhibiční účinnost těchto nukleotidů ve vztahu k jejich velikosti, afinitě a specifitě vazby a jejich přechodu do buňky. Z dosavadních experimentů se zdá být zřejmé, že právě přechod přes buněčnou membránu in vivo modelech je klíčovým problémem (47). Jako další možné inhibitory mohou působit rovněž látky typu azidothymidinu apod. (20). Terapie za využití genetických manipulací je dalším možným krokem. Uvedené strategie jsou v posledním období doplňovány rovněž možnostmi inhibovat funkci proteinů vázaných s telomery, vše se však dosud pohybuje na úrovni experimentálního modelu (20). Při všech těchto přístupech je třeba řešit problém nežádoucí možné blokády telomerázy např. v zárodečných buňkách. Zda bude klinické využití terapeutického ovlivnění telomerázy možné v blízké či ve vzdálenější budoucnosti, ukáže teprve vývoj výzkumných prací zabývajících této problematice.

6. Závěr.

Dosavadní data naznačují, že telomeráza může být specifickým a univerzálním nádorovým markerem. Její diagnostický, prognostický a terapeutický potenciál je v současnosti studován nejen na experimentálním modelu, ale i v rámci prospektivních klinických studií. Další vylepšení v metodologii napomůže zhodnotit její význam pro klinickou praxi. Oblast využití pro nádorovou terapii se zdá být rovněž slibná. V rámci řešení výzkumného projektu IGA MZ ČR jsme zahájili studii s názvem: Analýza aktivity telomerázy u benigních a maligních lézí prsu, jejíž výsledky budou publikovány po zhodnocení širšího experimentálního souboru.

Literatura.

1. Campisi J.: The biology of replicative senescence. *Eur.J.Cancer* 33, 1997, 703-709.
2. Oshimura M., Barrett J.C.: Multiple pathways to cellular senescence: role of telomerase repressors. *Eur.J.Cancer* 33, 1997, 710-715.
3. Parkinson E.K., Newbold R.F., Keith W.N.: The genetic basis of human keratinocyte immortalisation in squamous cell carcinoma development: the role of telomerase reactivation. *Eur.J.Cancer* 33, 1997, 727-734.
4. Wang E.: Senescent human fibroblasts resist programmed cell death and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res.* 55, 1995, 2284-2292.
5. Wellinger R.J., Sen D.: The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur.J.Cancer* 33, 1997, 735-749.
6. Morin G.B.: The implications of telomerase biochemistry for human disease. *Eur.J.Cancer* 33, 1997, 750-760.
7. Watson J.D.: Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature New Biol.* 239, 1972, 197-201.
8. Rosypal S.: Úvod do molekulární biologie. Vyd. S.Rosypal, Brno, 1996.
9. Blackburn E.H., Szostak J.W.: The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu.Rev.Biochem* 53, 1984, 163-194.
10. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 1994, 2011-2015.
11. Yashima K., Milchgrub S., Gollahon L.S., Maitra A., Saboorian M.H., Shay J.W., Gazdar A.F.: Telomerase enzyme activity and RNA expression during the multistage pathogenesis of breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 4, 1998, 229-234.
12. Kuniyasu H., Domen T., Haamamoto T., Yokozaki H., Yasui W., Tahara H., Tahara E.: Expression of human telomerase RNA is an early event of stomach carcinogenesis. *Jpn. J.Cancer Res.* 88, 1997, 103-107.
13. Odagiri E., Kanda N., Jibiki K., Demura R., Aikawa E., Demura H.: Reduction of telomeric length and c-erbB-2 gene amplification in human breast cancer, fibroadenoma, and gynecomastia. *Cancer*, 73, 1994, 2978 až 2984.
14. Breslow R.A., Shay J.W., Gazdar A.F., Srivastava S.: Telomerase and early detection of cancer: a national cancer institute workshop. *J.Nat.Cancer Inst.* 89, 1997, 618-623.
15. Shay J.W., Wright W., Srivastava S., Sidransky D., Langford L.: Researchers debate clinical role of telomerase. *J. Natl. Cancer Inst.*, 88, 1996, 1021-1023.
16. Harrington L., McPhail T., Mar V., Zhou W., Oulton R., EST Program A., Bass M.B., Arruda I., Robinson M.O.: A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275, 1997, 973-975.
17. Smith S., DeLange T.: TRF1, a mammalian telomeric protein. *TIG* 13, 1997, 21-26.
18. Conrad M.N., Domínguez A.M., Dresser M.E.: Ndj1p, a meiotic telomere protein required for normal chromosome synapsis and segregation in yeast. *Science* 276, 1997, 1252-1256.
19. Rhyu M.: Telomeres, telomerase, and immortality. *J.Natl.Cancer Inst.* 87, 1995, 884-894.
20. Holt S.E., Wright W.E., Shay J.W.: Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. *Eur.J.Cancer* 33, 1997, 761-766.
21. Bryan T.M., Reddel R.R.: Telomere dynamics and telomerase activity in vitro immortalised human cells. *Eur.J.Cancer* 33, 1997, 767-773.
22. Belair C.D., Yeager T.R., Lopez P.M., Reznikoff C.A.: Telomerase activity: A biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 94, 1997, 13677-13682.
23. Blasco M.A., Lee H.W., Hande P.M., Samper E., Landsorp P.M., DePinho R.A., Greider C.V.: Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomere RNA. *Cell* 91, 1997, 25-34.
24. Kyo S., Takakura M., Kohama T., Inoue M.: Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res.* 57, 1997, 610-614.
25. Brien T.P., Kallakury B.V., Lowry C.V., Ambros R.A., Muraca P.J., Malfetano J.H., Ross J.S.: Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma. *Cancer Res.* 57, 1997, 2760-2764.
26. Yoshida K., Sugino T., Goodison S., Warren B.F., Nolan D., Wadsworth S., Mortensen N.J., Toge T., Tahara E., Tarin D.: Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. *Brit.J.Cancer* 75, 1997, 548-553.
27. Villa R., Zaffaroni N., Folini M., Martelli G., De Palo G., Daidone M.G., Silvestrini R.: Telomerase activity in benign and malignant breast lesions: a pilot prospective study on fine-needle aspirates. *J.Natl. Cancer Res.* 90, 1998, 537-539.
28. Kim N.W.: Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur.J.Cancer* 33, 1997, 781-786.
29. Shay J.W., Bacchetti S.: A survey telomerase activity in human cancer. *Eur.J.Cancer* 33, 1997, 787-791.
30. Hoos A., Hepp H.H., Kaul S., Ahlert T., Bastert G., Wallwiener D.: Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int.J.Cancer* 79, 1998, 8-12.
31. Bednarek A.K., Sahin A., Brenner A.J., Johnston D.A., Aldaz C.M.: Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin. Cancer Res.*, 3, 1997, 11-16.
32. Sugino T., Yoshida K., Bolodeoku J., Tahara H., Bulez I., Manek S., Wells C., Goodison S., Ide T., Suzuki T., Tahara E., Tarin D.: Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: Diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. *Int.J.Cancer* 69, 1996, 301-306.
33. Hiyama E., Gollahon L., Kataoka T., Kuroi K., Yokoyama T., Gazdar A.F., Hiyama K., Piatyszek M.A., Shay J.W.: Telomerase activity in human breast tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 88, 1996, 116-122.
34. Tsao J.-I., Zhao Y., Lukas J., Yang X., Shah A., Press M., Shibata D.: Telomerase activity in normal and neoplastic breast. *Clin. Cancer Res.* 3, 1997, 627-631.
35. Landberg G., Nielsen N.H., Nilsson P., Emdin S.O., Cajander J., Roos G.: Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 57, 1997, 549-554.
36. Mokbel K., Ghilchik M.: Re:Telomerase activity in human breast tumors. *J.Natl.Cancer Inst.* 88, 1996, 839.
37. Carey L.A., Hedican C.A., Henderson G.S., Umbricht Ch.B., Dome J.S., Varon D., Sukumar S.: Careful histological confirmation and microdissection reveal telomerase activity in otherwise telomerase-negative breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 4, 1998, 435-440.
38. Kyo S., Takakura M., Tanaka M., Murakami K., Saitoh R., Hirano H., Inoue M.: Quantitative differences in telomerase activity among malignant, premalignant, and benign ovarian lesions. *Clin. Cancer Res.* 4, 1998, 399-405.
39. Murakami J., Nagai N., Ohama K., Tahara H., Ide T.: Telomerase activity in ovarian tumors. *Cancer* 80, 1997, 1085-1092.
40. Kyo S., Takakura M., Kohama T., Inoue M.: Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res.* 57, 1997, 610-614.
41. Takakura M., Kyo S., Kanaya T., Tanaka M., Inoue M.: Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res.* 58, 1998, 1558-1561.
42. Yashima K., Ashfaq R., Nowak J., Von Gruenigen V., Milchgrub S., Rathi A., Albores-Saavedra J., Shay J.W., Gazdar A.F.: Telomerase activity and expression its RNA component in cervical lesions. *Cancer* 82, 1998, 1319-1327.
43. Dalbagni G., Han W., Zhang Z.-F., Coedon-Cardo C., Saigo P., Fair W.R., Herr H., Kim N., Moore M.A.S.: Evaluation of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay for telomerase as a diagnostic modality in recurrent bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 3, 1997, 1593-1598.
44. Rhyu M.S.: Telomeres, telomerase, and immortality. *J.Natl. Cancer Inst.*, 87, 1995, 884-894.
45. Tahara E., Semba S., Tahara H.: Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin. Oncol.* 23, 1996, 307-315.
46. Hiyama E., Hiyama K., Yokoyama T., Matsuura Y., Piatyszek M.A., Shay J.W.: Correlation of telomerase activity level with human neuroblastoma outcome. *Nat. Med.* 1, 1995, 249-255.
47. Pitts A.E., Corey D.R.: Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA. *Proc. Natl.Acad.Sci USA*, 95, 1998, 11549-11554.

Práce byla podpořena grantovým projektem NM17/3 IGA MZ ČR.